



TITLE:

Flow cytometry による Bromodeoxyuridine(BrdU) /DNA同 時解析法の応用 1.その基礎的・技 術的検討

AUTHOR(S):

島袋, 智之

CITATION:

島袋, 智之. Flow cytometry によるBromodeoxyuridine(BrdU) /DNA同時解析法の応用 1.その基礎的・技術的検討. 泌尿器科紀要 1988, 34(8): 1339-1348

ISSUE DATE:

1988-08

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/119682>

RIGHT:

Flow cytometry による Bromodeoxyuridine (BrdU)/DNA 同時解析法の応用

1. その基礎的・技術的検討

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 酒徳治三郎教授)

島 袋 智 之

APPLICATION OF SIMULTANEOUS FLOW CYTOMETRIC BROMODEOXYURIDINE (BrdU)/DNA ANALYSIS

1. BASIC AND TECHNICAL STUDIES

Tomoyuki SHIMABUKURO

From the Department of Urology, Yamaguchi University School of Medicine
(Director: Prof. J. Sakatoku)

The precise *in vitro* and *in vivo* BrdU labeling methods and the optimal combination of HCl concentration, treatment time and temperature for DNA denaturation for use in simultaneous flow cytometric BrdU/DNA analysis were investigated. An EPICS C Cell Sorter with computer analyser was used. 1) For precise labeling of exponentially growing MBT-2 cells the cells should be exposed to 10 μ M BrdU for 30 min. 2) For optimal labeling of mouse subcutaneous MBT-2 tumor cells 40 μ g of BrdU per g should be injected intraperitoneally for 1 hour. 3) The procedure yielding the most quantitative results for DNA denaturation was treatment of the cells with 4N HCl for 20 min at 20°C.

Under these conditions, reliable data were always obtained. In the future, this flow cytometric two-color analysis will be applied to clinical fields and further development is expected.

(Acta Urol. Jpn. 34: 1339-1348, 1988)

Key words: Flow cytometry, Bromodeoxyuridine, Monoclonal antibody, DNA denaturation

緒 言

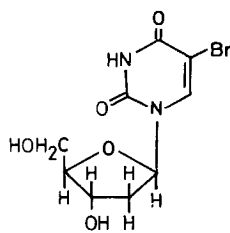
Flow cytometry (FCM) による癌組織の細胞動態解析は、従来 DNA 分布解析によって行われてきた^{1,2)}。この手技は比較的簡便かつ迅速に結果が得られ、また ³H-thymidine などの放射性同位元素を用いないで済むなどの利点を有している。しかしながら、臨床分野へ応用しようとする次のような克服すべき問題点や欠点があり、これに代わる新しい解析法の確立が急がれる。(1)細胞分散の問題。(2)結合織や間質細胞の混在が避けられないため癌細胞のみの細胞動態解析が困難である。(3)得られた結果の解析には複雑な数学的解析法を用いなければならない。(4)標識細胞を検出できない。(5)細胞動態の動的局面に関する情報が得られない。

最近、DNA 中に取り込まれた 5-bromodeoxyuridine (BrdU, Fig. 1) に対するモノクローナル抗体

が開発され、この抗体を用いて BrdU を蛍光染色することにより、FCM で DNA 合成能の分布を測定することが可能となった^{3,4)}。さらに BrdU 染色と DNA 染色を同時に行うことにより、DNA 合成能を DNA 量との関係において定量的に捉えることが可能となってきた⁵⁾。したがって、この手技は DNA 分布解析法に代わり、今後幅広い臨床応用が期待されるが、その条件として定量性と再現性のある測定結果を得ることが是非とも必要となってくる。このような観点から、BrdU 標識法と DNA 変性法に関する基礎的・技術的検討を行うことは、極めて意義のあることと考えられる。ここでは FCM による BrdU/DNA 同時解析法のための基礎的・技術的検討結果を報告する。

材 料 と 方 法

1) *In vitro* 実験 (培養細胞と培養法)



5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)

Fig. 1. Structure of bromodeoxyuridine (BrdU).

使用した培養細胞は FANFT 投与にて誘発されたマウス膀胱移行上皮細胞由来の MBT-2 細胞である。通常マウス背部皮下で継代されている MBT-2 細胞を、当教室で単層培養化し実験に供した。

細胞の継代には 25 cm² tissue culture flask (Falcon 3013) を用いた。通常、1 週間毎に 0.25% trypsin (Difco, USA) 処理を行い、95% air と 5% CO₂, 100% humidity 培養器内で培養した。

培養液は 10% FCS 加 Dolbecco's MEM (大日本製薬、大阪) を用いた。

Ⅱ) *In vivo* 実験 (腫瘍細胞と継代法)

使用した腫瘍細胞は MBT-2 細胞とマウス白血病 L1210 細胞である。MBT-2 細胞の動物での継代には雌性 C3H マウス (千代田開発 K. K.) を用いた。通常、マウス背部皮下腫瘍を 2 週間ごとに摘出し、0.05% collagenase (Sigma Co. Type I) にて細胞分散を行い、単離細胞にしたあと、 1×10^6 個の細胞を再び皮下に移植した。L1210 細胞の継代には雌性 CDF₁ マウス (同上) を用い、通常 1 週間毎にマウス腹腔内に $1 \times 10^5/0.2$ ml (PBS) の腫瘍細胞を接種した。

(1) 蛍光抗体法による染色性の確認

蛍光抗体法による染色性を蛍光顕微鏡にて観察するために、以下の処理を行った。すなわち、60×15 mm tissue culture dish (Falcon 3002) に脱脂したカバーガラスを静置し、MBT-2 細胞を 1×10^4 /ml の単離細胞浮遊液として播種したあと 3 日間培養し、その表面に生着させた。培養液を洗浄除去後 BrdU (Sigma Co.) 最終濃度が 10 μM になるように調整された培養液に置換し、30 分間標識した。カバーガラス上の細胞を Dolbecco's PBS (Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ free) で洗浄後、70% 冷 ethanol で 30 分間固定した。PBS で洗浄後、4N 塩酸で室温 30 分間の DNA 変性処理を行った。塩酸を洗浄除去し、0.1 M Na₂B₄O₇ 液を用

いて細胞を十分に中和した。ついで、0.5% bovine serum albumin と 0.5% Tween 20 よりなる抗体希釈液 (PBS にて調製) にて 100 倍に希釈された抗 BrdU モノクローナル抗体 (Becton-Dickinson Co.) を湿室内で 1 時間反応させた。引き続き、抗体希釈液で 100 倍に希釈された FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (Cappel Lab.) を室温で 30 分間反応させた。最後に、0.1 μg/ml の Propidium Iodide (Sigma Co. PI) で 1 分間の DNA 染色を行い、蛍光顕微鏡で染色性の確認と標識率 (LI) を算定した。標識率は 2000 個の細胞を観察して算出した。対照は BrdU を含まない培養液を用いて培養された細胞を用い、以後全く同様の方法で処理し観察した。

(2) BrdU 至適処理条件の検討

接触させる BrdU 濃度は、細胞増殖能に悪影響を及ぼさない濃度でかつ十分に細胞の標識が可能な濃度でなければならない。この至適処理条件を確立する目的で以下の実験を行った。

(a) 濃度の検討

75 cm² tissue culture flasks (Corning 25110) に 1×10^5 個の MBT-2 細胞を播種し、対数増殖期にある 4 日目に 5 群 (1 群 3 flasks) に分け、各群の flask の培養液をそれぞれ 1.25 μM, 2.5 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM の BrdU を含む培養液に置換して 30 分間標識した。PBS で 2 回洗浄後、0.1% trypsin-0.02% EDTA 液 (PBS で調整) にて細胞分散を行い、70% 冷 ethanol で固定し、FCM 測定まで 4°C で保存した。

(b) 標識時間の検討

同様に 4 日培養後の MBT-2 細胞を 5 群に分け、BrdU 最終濃度が 10 μM になるように調整された培養液で各群それぞれ 5 分間、15 分間、30 分間、60 分間、120 分間の標識を行った。以後 (a) と同様に細胞分散を行い固定・保存した。

(c) 投与量の検討

5 週齢の雌性 C3H マウス (17~21 g) の背部皮下に 1×10^6 個の MBT-2 細胞を移植し、2 週間後約 10×10 mm の大きさに増殖した癌組織を有するマウスを 5 群 (1 群 3 匹) に分けた。各群の腹腔内に 5 μg/g, 10 μg/g, 20 μg/g, 40 μg/g, 60 μg/g 体重の BrdU を投与したあと、1 時間後に屠殺し癌組織を摘出した。直ちにメスの刃を用いて細切し、0.1% collagenase (Sigma Co. Type II) にて 37°C, 1 時間の細胞分散処理を行い、*in vitro* 実験と同様に固定し保存した。

(3) DNA 変性処理に関する検討

塩酸による DNA 変性処理は、PI 蛍光強度、CV 値、DNA 分布あるいは BrdU/DNA 分布パターンに影響を及ぼすため、その3つの条件である(a)処理濃度、(b)処理時間、(c)処理温度について以下の実験を行い検討した。

(a) 塩酸処理濃度の検討

5週齢の雌性 CDF₁ マウス (18~22 g) 腹腔内に 1×10^6 個の L1210 細胞を接種し、対数増殖期にある72時間目に $40 \mu\text{g/g}$ 体重の BrdU を腹腔内に投与、1時間後に屠殺し腹水細胞を採取した。PBS にて2回遠沈洗浄後、細胞塊を取り除くため $48 \mu\text{m}$ pore size の nylon mesh を通過させ、固定し保存した。同一マウスより得られた 1×10^7 個の細胞を容量 10 ml の遠沈管に分注し、一測定検体として実験に供した。

各ペレットにそれぞれ 0 N, 0.2 N, 0.5 N, 1 N, 2 N, 3 N, 4 N の塩酸 2 ml を加え、室温 (23°C) で20分間の DNA 変性処理を行った。塩酸を洗浄除去後、0.1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 液 10 ml で2回、PBS で1回洗浄し細胞を中和した。ついで $50 \mu\text{g/ml}$ の PI にて1時間の DNA 染色を行い、FCM にて PI の蛍光強度を測定した。さらに細胞株による DNA 変性度合に差異があるか否かの検討を加えるため、MBT-2 皮下腫瘍の単離細胞を用い全く同様に処理を行い比較した。

(b) 塩酸処理時間の検討

固定細胞を同様に洗浄し、それぞれのペレットに 4 N 塩酸 2 ml を加え、温度条件を 23°C 室温と一定にして塩酸処理時間をそれぞれ5分間、10分間、20分間、40分間とした。以後(a)と同様に中和処理し、染色を行い PI の蛍光強度を測定した。

(c) 塩酸処理温度の検討

同様に固定細胞を遠沈洗浄し、それぞれのペレットに 4 N 塩酸 2 ml を加え、処理時間を20分間と一定にして、処理温度をそれぞれ 4°C, 23°C (室温), 37°C とした。以後(a)と同様に中和処理し、染色を行い PI の蛍光強度を測定した。

(d) 塩酸処理温度の PI-FITC 分布パターンに及ぼす影響

上記(c)の各温度処理群に後述する免疫蛍光二重染色を行い、FCM にて PI-FITC 同時測定を行った。

免疫蛍光染色・Fig. 2 に FCM 測定のための免疫蛍光二重染色法の概要を示した。一測定検体当たり約 5×10^6 個の細胞数になるように調整したあと、PBS にて2回洗浄し 4 N 塩酸を 2 ml ずつ加え、室温に

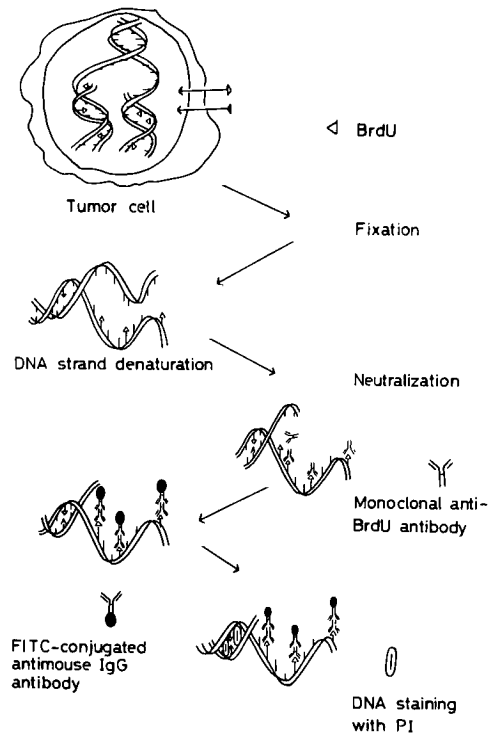


Fig. 2. Principle of the immunofluorescent staining for BrdU/DNA analysis.

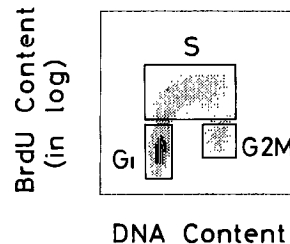


Fig. 3. A bivariate BrdU/DNA distribution measured for MBT-2 cells immediately after a 30-min labeling with BrdU. Also shown are regions describing the G_1 , S, and G_2M populations. The Y-axis is \log_{10} green fluorescence of fluorescein (BrdU content) and the X-axis is linear intensity of red fluorescence of PI (DNA content).

て20分間の DNA 変性処理を行った。塩酸を除去したあと、0.1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 液 10 ml で2回、続いて PBS で1回洗浄し細胞を中和した。100倍希釈抗 BrdU 抗体を室温で1時間反応させ、ついで100倍希釈 FITC 標識二次抗体を室温で30分間反応させた。最後に $20 \mu\text{g/ml}$ の PI で1時間染色し、FCM にて測定した。

フローサイトメトリー 測定装置は EPICS C

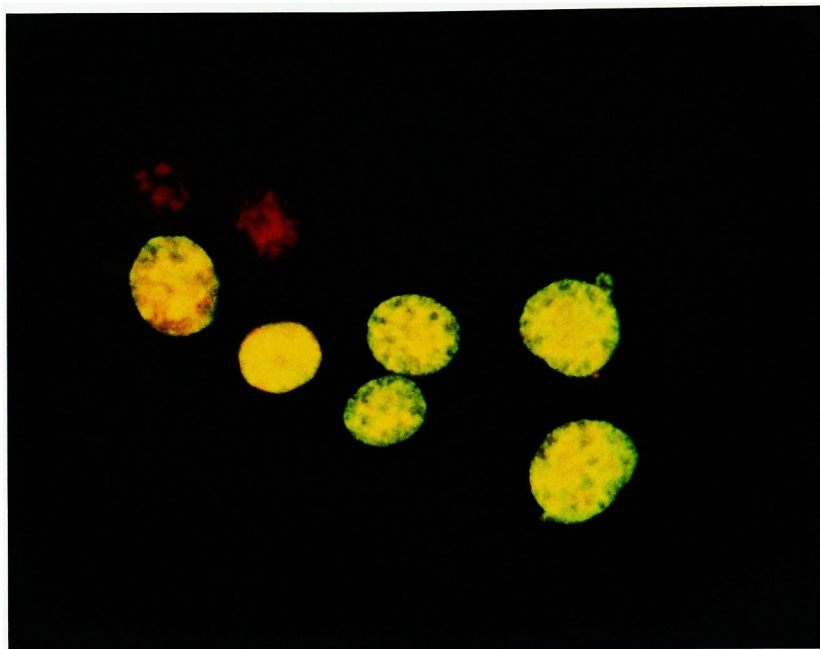


Fig. 4. Immunofluorescent staining of BrdU-labeled MBT-2 cells with monoclonal antibody.

Cell Sorter (Coulter Electronics, Inc.) を用いた。励起光は波長 488 nm, 200 mW のレーザー光線を用いて行い、PI よりの赤色蛍光は 630 nm-long wave pass filter を通して測定し、FITC よりの緑色蛍光は 560 nm-short wave pass filter と 525 nm-band pass filter を組合せて測定した。さらに PI と FITC の蛍光を同時に測定し、PI の蛍光強度を横軸に FITC の蛍光強度を縦軸にとり、 64×64 channels の二次元座標上に dot plot として表示した。装置を CV 値が 2% 台になるように調整したあと、1 検体当たり 2×10^4 個の細胞について測定した。

データ解析：DNA 分布解析は田中らの方法²⁾を用いて行った。PI-FITC 同時測定による場合は Fig. 3 に示すように、二次元座標上で細胞周期各期を矩形で囲み、その範囲内の細胞数を求め、全測定細胞数に対するそれぞれの割合として算出した。LI は同様に全測定細胞に対する標識細胞の割合として算出した。

結 果

(1) 蛍光抗体法による染色性の確認 (Fig. 4)

蛍光顕微鏡での観察では、核が FITC よりの黄緑色蛍光にて明瞭に染色された標識細胞と赤色蛍光のみの非標識細胞を認め、両者は容易に識別できた。蛍光顕微鏡下に 2,000 個の細胞を数えて算出した標識細胞の割合 (labeling index; LI) は約 35% であり、この値は FCM の二次元座標上でもとめた LI とよく一致していた。対照群では緑色蛍光標識された細胞は全く認められなかった。

(2) BrdU 至適処理条件の検討

(a) 至適処理濃度の検討 (Fig. 5)

各群における緑色蛍光強度には BrdU 濃度により明らかな有意差はなかった。1.25 μ M という極めて低い濃度で処理された細胞群においても取り込まれた BrdU を充分検出でき、二次元座標上で解析可能であった。各濃度群で算出した LI には有意差がなく、 $36.0 \pm 0.7\%$ (mean \pm S.E.) であった。

(b) 至適標識時間の検討 (Fig. 6)

接触させる BrdU 濃度を 10 μ M と一定にした場合、標識細胞の緑色蛍光強度は接触時間に比例して増加した。120 分までの接触時間 (T) と緑色蛍光の

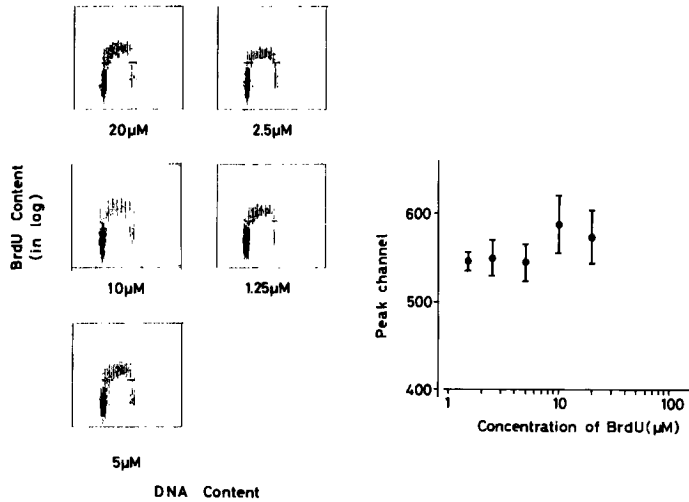


Fig. 5. Dot plots of bivariate BrdU/DNA distributions measured for exponentially growing MBT-2 cells labeled with various concentrations of BrdU (μM) (left). A plot showing the correlation between concentration of BrdU and mean peak channel number of BrdU-linked green fluorescence. Bar shows standard deviation (right).

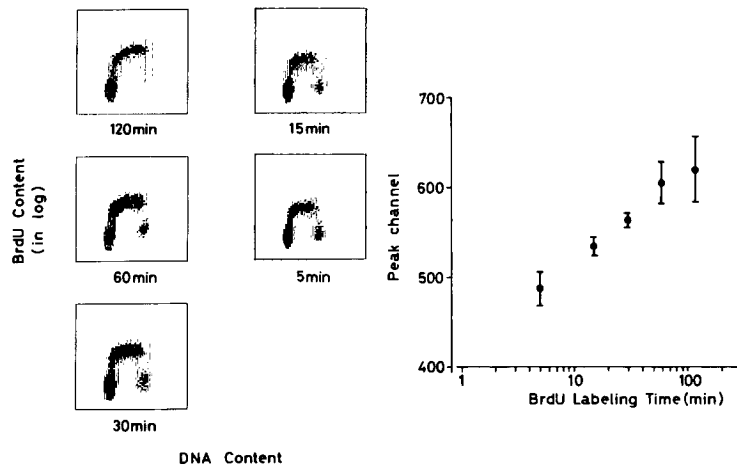


Fig. 6. Dot plots of bivariate BrdU/DNA distributions measured for exponentially growing MBT-2 cells labeled with 10 μM BrdU for various time periods (min) (left). A plot showing the correlation between time of BrdU labeling and mean peak channel of BrdU-linked green fluorescence. Bar shows standard deviation (right).

Peak channel number (N) との関係をもてみると、 $N = 515.760 + 1.017 \times T$ ($r = 0.825$) と密な相関が得られた。検討した120分までは、各時間群で算出した LI に有意差がなく、 $35.1 \pm 1.0\%$ (mean \pm S.E.) であった。

(c) 至適投与量の検討 (Fig. 7)

BrdU 一回腹腔内投与の場合、標識細胞の緑色蛍光強度は BrdU が 40 $\mu\text{g/g}$ 体重まではその投与量に

比例して増強し、それ以上の BrdU を投与しても緑色蛍光強度の増加はわずかであった。各投与群で算出した LI の間には有意差がなく、 $21.5 \pm 2.6\%$ (mean \pm S.E.) であった。

(3) DNA 変性処理に関する検討

(a) 塩酸処理濃度の検討 (Fig. 8)

塩酸濃度 0.2 N までは PI 蛍光強度は濃度と共に増強し、以後濃度が増すにつれ減弱した。しかし CV

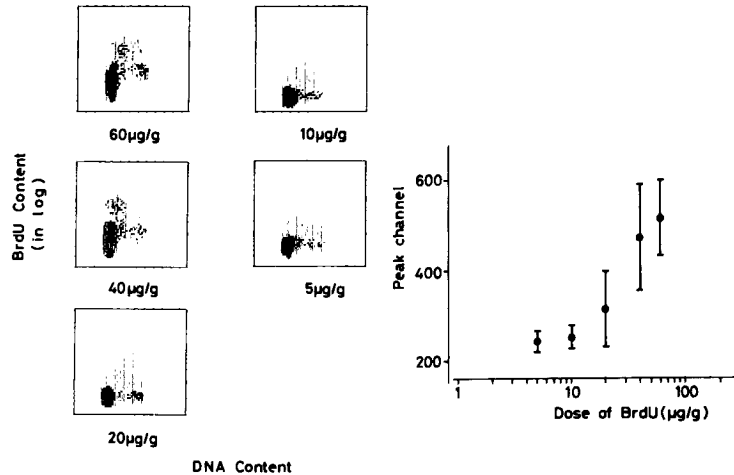


Fig. 7. Dot plots of bivariate BrdU/DNA distributions measured for MBT-2 cells obtained from C₃H mice labeled with various doses of BrdU ($\mu\text{g/g}$) for 1 hour (left). A plot showing the correlation between doses of BrdU and mean peak channel number of BrdU-linked green fluorescence. Bar shows standard deviation (right).

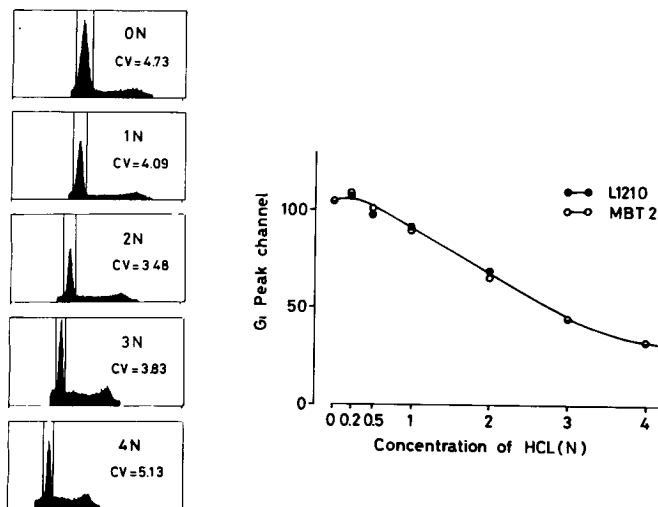


Fig. 8. DNA distribution histograms after a 20-min treatment with various concentrations of HCl (N) and also CV value of each histogram (left). A plot showing the correlation between concentration of HCl and G₁ peak channel (right).
●—●: L1210 cell, ○—○: MBT-2 cell.

値は各濃度間で大きな違いはなかった。また DNA 分布自体にも各濃度間で大きな変化がなく、常に良好に保たれていた。L1210 細胞、MBT-2 細胞と細胞の種類は異なっているが、DNA 変性度合にはほとんど差異がなかった。

(b) 塩酸処理時間の検討 (Fig. 9)

塩酸処理時間が長くなるにつれ、PI 蛍光強度は減

弱した。処理時間 40 分では CV 値が他群に比べ大きくなったが、DNA 分布自体には著明な変化がなかった。

(c) 塩酸処理温度の検討 (Fig. 10)

処理温度が上昇するにつれ PI 蛍光強度は減弱し、逆に FITC 蛍光強度は増強した。それゆえ同一画面上に表示するには、4°C 処理群においては photo-

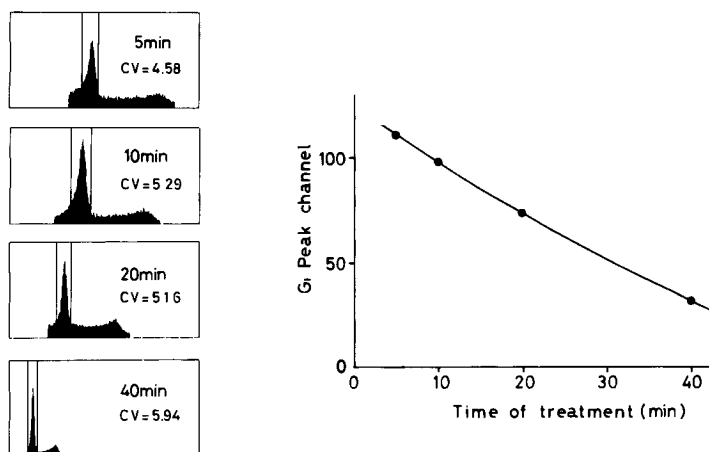


Fig. 9. DNA distribution histograms after treatment with 4NHCl for various time periods (min) and also CV value of each histogram (left). A plot showing the correlation between length of time of 4NHCl treatment and G₁ peak channel (right).

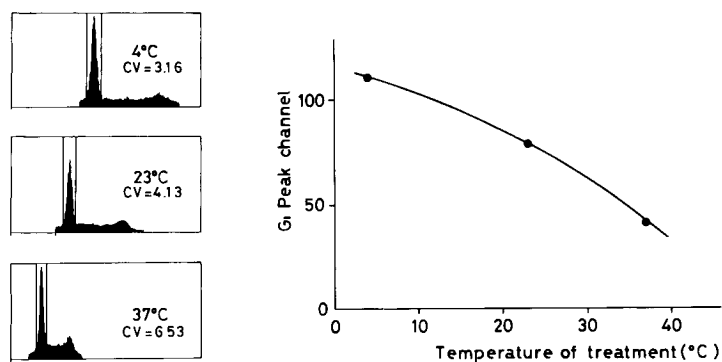


Fig. 10. DNA distribution histograms after a 20-min treatment with 4NHCl at various temperatures (°C) and also CV value of each histogram (left). A plot showing the correlation between temperature of HCl treatment and G₁ peak channel (right).

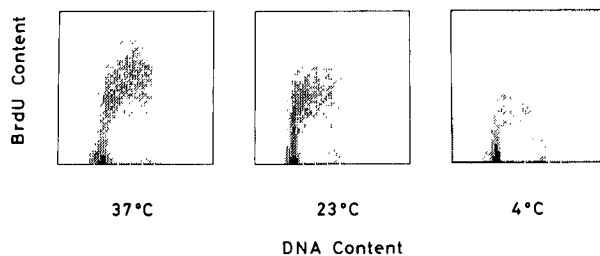


Fig. 11. Dot plots of bivariate BrdU/DNA distributions measured for exponentially growing L1210 cells after a 20-min treatment with 4NHCl at various temperatures.

multiplier の voltage を約 5% 増強させなければならなかった。温度が上昇するにつれ CV 値は大きく

なる傾向にあり、特に 37°C 処理群において明らかであった。しかし各群とも DNA 分布は比較的良好に

保たれていた。

(d) 処理温度の BrdU/DNA 分布に及ぼす影響 (Fig. 11)

各処理温度群とも BrdU/DNA 分布パターンは良好に保たれ、二次元座標上での解析は容易であった。この三群における細胞動態解析結果はほぼ等しく、 $G_0/G_1=36.9 \pm 2.7\%$ (mean \pm S.E., 以下同様), $S=58.3 \pm 2.6\%$, $G_2M=4.9 \pm 0.1\%$ そして $LI=55.9 \pm 2.5\%$ であった。

考 察

5-bromodeoxyuridine (BrdU) は halogenated pyrimidine analogue で、その pyrimidine 環の 5 の位置の CH_3 基が臭素原子に置き変わった構造を有している (Fig. 1)。BrdU 存在下では DNA 合成中の細胞は thymidine と BrdU とを区別することができず、核酸を構成する一要素として BrdU も新生 DNA 中へ取り込んでしまう。BrdU を取り込んだ細胞の DNA を部分的に変性させ、取り込まれた BrdU を露出して抗 BrdU モノクローナル抗体を作用させると、抗体は特異的に BrdU と結合する。DNA 変性処理が必要な理由は、二重鎖 DNA 内の BrdU にはこの抗体は反応しないからである。この時さらに FITC を標識した二次抗体を作用させると、DNA 内に BrdU を取り込んだ細胞核は緑色蛍光を発するようになる。これに二重鎖 DNA にのみ結合する PI にて DNA 染色を行い、蛍光顕微鏡で観察すると Fig. 4 のようになる。この時 BrdU 処理を受けなかった対照群で、緑色蛍光標識された細胞が全く認められなかったことは、この抗体が BrdU に対して高い specificity を有していることを証明している。したがって逆に、この抗体にて検出された細胞は、確実に BrdU を取り込んだ DNA 合成期細胞と考えることができる。

しかしながら、BrdU は thymidine とは異なり、DNA へ取り込まれる途中、または次の複製で塩基対変化をおこす結果、高率に変異を招く。このことから生化学や分子生物学の領域で変異誘発剤として研究されていた。また BrdU を充分量細胞に作用させると変異誘発や細胞分化抑制以外にも、細胞毒として働くとの報告⁶⁾もある。したがって細胞増殖能への悪影響を少しでも避けるためには、その使用量および接触時間は必要最小限にしなければならない。われわれが colony assay を用いて検討した結果では、 $20 \mu M$ の BrdU 濃度下で 2 時間培養したあとも、MBT-2 細胞のコロニー形成能はコントロールと同程度に保たれ

ていた⁷⁾。この実験結果は BrdU 濃度を $20 \mu M$ 以下、接触時間を 2 時間以内にすれば、細胞増殖能に悪影響をおよぼすことのない BrdU 量で細胞の標識が可能であり、細胞増殖能や抗癌剤投与後の細胞動態の変化を観る際にも、BrdU 自体による影響を短期的には無視できることを意味していると考えられる。また BrdU 処理濃度の検討結果より、 $10 \mu M$ 前後の BrdU 濃度で 30 分間標識すれば、十分に FCM を用いて標識細胞の検出や二次元座標上での細胞動態解析が可能であることから、われわれは *in vitro* の実験の際には BrdU 濃度を $10 \mu M$ とし、30 分間の標識を行っている。注目すべきは $1.25 \mu M$ という極めて低い濃度の BrdU との接触でも、FCM を用いて標識細胞の検出や解析が可能であったということである。このことは、この抗 BrdU 抗体を用いる方法が高い sensitivity を有していることを証明している。

BrdU の標識時間に関する検討結果では、BrdU との接触時間がより長い細胞群、すなわちより多くの量の BrdU を取り込んだ群ほどより強い緑色蛍光強度を呈しており、この両因子には明らかに正の相関が得られた。Gratzner や Dolbeare らは、抗 BrdU モノクローナル抗体は BrdU と stoichiometric に結合する結果、FITC よりの緑色蛍光強度は取り込まれた BrdU 量に比例すると報告^{4,5,8)}しており、今回の実験結果もこのことを裏付けるものであった。また、Dolbeare らは僅か 3 分間の標識時間に取り込まれた BrdU でも検出できたと報告⁹⁾している。今回の実験では標識時間は 5 分間までであるが、preliminary な実験では 2.5 分間のパルス時間内に取り込まれた BrdU でも検出可能であることを確認している。このことも、この抗体法が極めて鋭敏で感度の高い方法であることを物語っている。

In vitro における BrdU 至適投与量の検討を行った実験結果から、マウスにおける至適投与量は、 $40 \mu g/g$ 体重であると考えられた。Nagashima らはラット脳腫瘍モデルを用いて検討を行い、 $1 mg/kg$ ($7 mg/m^2$) の BrdU 腹腔内 1 回投与でも標識細胞の検出が可能であったと報告⁹⁾している。

BrdU/DNA 二重染色のためには BrdU 染色のための単鎖 DNA と PI 染色のための二重鎖 DNA が必要である。したがって、再現性と定量性のある測定結果を得るためには適正な DNA 変性処理法が必要である。DNA 変性処理法としては、1) 塩酸、2) formamide、3) 熱、4) それらの併用による方法が報告されている^{5,8,10,11)}。その中で、塩酸を用いる方法は熱変性法などに比べ細胞にマイルドに作用し、細胞数の

損失も少なく、簡便でより多くの種類の細胞に適用できる特徴を有している。しかしながら、塩酸処理の至適条件が確立されたとは言いがたい。そこで塩酸処理の至適条件をもとめて、塩酸濃度、処理時間そして処理温度の PI 蛍光強度、CV 値、DNA 分布あるいは BrdU/DNA 分布パターンに及ぼす影響を比較検討した。

処理温度および時間条件を室温 (23°C)・20 分間と一定にし、濃度条件を変えて検討した実験結果 (Fig. 8) は、低濃度塩酸処理では PI の蛍光強度は対照よりむしろ増強し、高濃度塩酸処理では減少することを示している。この PI 蛍光強度の変動は、低濃度塩酸処理では histone が溶出し、PI の DNA 二重鎖部への intercalation が増え、高濃度処理では二重鎖部がより多く失われる結果 PI の intercalation が減るためと考えられている。この際緑色蛍光強度のバラツキを小さくし、解析結果を再現性のあるものにするためには、CV 値が大きくなりすぎない限りにおいて、なるべく高濃度の塩酸処理を行った方が有利である。しかし、あまり高濃度の塩酸処理では細胞に対するダメージが大きくなり、また CV 値も大きくなり、DNA 分布解析も不正確になる。したがって 4N 濃度の塩酸使用が適当だと考えられた。なお L1210 細胞、MBT-2 細胞ともほぼ同様のカーブを描いていることから、対象とする細胞の違いによる変性度合の差はあまり大きくないことが示唆された。

処理濃度および温度条件を 4N、室温と一定にし、処理時間を変えて検討した結果 (Fig. 9) では、処理時間 20 分までは CV 値および DNA 分布パターンは良く保たれており、それ以上の処理時間では CV 値が大きくなっていった。すなわち、この条件下で 40 分以上塩酸処理することは DNA 分布解析結果を不正確にする可能性のあることを示している。したがって 20 分から 30 分間の塩酸処理が適切だと考えられた。

処理濃度および時間条件を 4N・20 分間と一定にし、処理温度を変えて検討した結果 (Fig. 10, 11) より、37°C 処理においては DNA 分布、BrdU/DNA 分布パターンとも比較的良く保たれていたが、明らかに CV 値は大きくなっていった。また、4°C 処理においては緑色蛍光強度が低く、不安定な状態であった。これらのことから、20°C 前後が至適処理温度と考えられた。以上の実験結果より、至適塩酸処理条件は塩酸 4N、処理時間 20 分間、処理温度 20°C であると考えられた。この塩酸処理法を用いて二重染色を行う際に重要なことは、塩酸処理のあと酸を十分に中和し、適当な pH を確保することである。このことについ

ては高橋らの論文に詳しい¹²⁾。

このように DNA 変性過程は塩酸濃度、処理時間、処理温度の各条件によって微妙に影響されていたが、上記条件下で変性処理を行うことにより、ほぼ満足のいく測定結果が得られた。しかしながら、塩酸処理法が全ての細胞に適切な DNA 変性法として適用できるとは限らない。したがって定量性・再現性のある解析結果を得るためには、対象とする細胞によっては他の変性法も試みる必要があると思われる。

結 語

1) Flow cytometry (FCM) による BrdU/DNA 同時解析法の臨床応用を目的として、その基礎的・技術的検討を行った。

2) *In vitro* における BrdU 標識のための至適条件は、最終濃度 10 μ M の BrdU 含有培養液中で 30 分間培養標識することであった。

3) *In vivo* での BrdU 標識のための至適条件は、40 μ g/g マウス体重の BrdU を腹腔内 1 回投与し、1 時間標識することであった。

4) DNA 変性のための至適条件は、4N 塩酸を用い、20°C で 20 分間の変性処理を行うことであった。

5) これらの条件下では、ほぼ満足のいく BrdU/DNA 同時解析結果が得られた。

6) FCM による BrdU/DNA 同時解析法は細胞動態解析法としてのみならず、広く臨床応用も可能であり、今後の発展が期待される。

本論文の要旨は第 24 回日本癌治療学会総会 (1986) にて発表した。稿を終えるにあたり、本論文の御指導、御校閲を賜りました山口大学泌尿器科学教室酒徳治三郎教授に感謝の意を表します。また、BrdU/DNA 同時染色法および Flow cytometry 測定法に関して、終始適切な助言と御指導を頂いた、本学病理学教室高橋 学教授に深謝いたします。さらに、培養細胞を用いた感受性試験や、実験計画に際し、直接的な御指導を頂いた、本学泌尿器科学教室山本憲男助教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 高橋 学: DNA 分布の解析. フローサイトメトリー—手技と実際—, 太田和夫・野村和弘編, 初版, 529-542, 蟹書房, 東京, 1984
- 2) 田中一成, 高橋 学: マイクロコンピュータによる DNA ヒストグラムの解析. 関西フローサイトメトリー研究会機関誌 3: 82-84, 1985
- 3) Gratzner HG: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine; a new reagent for detection of DNA replication. Science 218: 474-475, 1982

- 4) Gratzner HG and Leif RC: An immunofluorescence method for monitoring DNA synthesis by flow cytometry. *Cytometry* 1: 385-389, 1981
- 5) Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini MG and Gray JW: Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5573-5577, 1983
- 6) Goz B: The effect of incorporation of 5-halogenated deoxyuridine into the DNA of eukaryotic cells. *Pharmacol Rev* 29: 249-272, 1978
- 7) Shimabukuro T: Preliminary study of flow cytometric DNA/BrdU analysis with the aim of application to drug-sensitivity test. *J Jpn Soc Cancer Ther* 22: 433, 1987
- 8) Dolbeare F, Beisker W, Pallavicini MG, Vanderlaan M and Gray JW: Cytochemistry for bromodeoxyuridine/DNA analysis; Stoichiometry and sensitivity. *Cytometry* 6: 521-530, 1985
- 9) Nagashima T and Hoshino T: Rapid detection of S-phase cells by anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody in 9L brain tumor cells in vitro and in situ. *Acta Neuropathol (Berl)* 66: 12-17, 1985
- 10) Moran R, Darzynkiewicz Z, Staianocoico L and Melamed MR: Detection of 5-bromodeoxyuridine incorporation by monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 33: 821-827, 1985
- 11) Beisker W, Dolbeare F and Gray JW: An improved immunocytochemical procedure for high-sensitivity detection of incorporated bromodeoxyuridine. *Cytometry* 8: 235-239, 1987
- 12) 高橋 学, 佐々木 功典, 村上知之: Bromodeoxyuridine 標識による細胞動態の解析. *最新医学* 40: 80-84, 1985

(1988年5月6日迅速掲載受付)